

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Remarks

Claims 10 to 22 remain pending in this application. No Claims have been amended. Applicant requests the Examiner to reconsider the rejections based on the following arguments:

Objection to the Specification

The Examiner has objected to the abstract since it does not commence on a separate page as required under 37 CFR 1.52(b) (4). Applicant submits that a substitute specification is attached with this response where the abstract complies with 37 CFR 1.52(b) (4). In addition various subheadings have been added as requested by the Examiner.

Claim Rejections under 35 U.S.C § 112

Claims 14 to 16 have been rejected under 35 USC §112, second paragraph, as being indefinite for failing to particularly point out and distinctly claim the subject matter which applicant regards as the invention. Additionally, Examiner states that Claim 14 recites “matrix inclusion” and that it is unclear what the meaning of this term is.

Applicant submits that the term “matrix inclusion” as used herein has the same meaning to “matrix entrapment”. Applicant submits that since the original application was filed in German language, the word “Matrixeinschluss” was translated to “matrix inclusion” and not to “matrix entrapment”. The Applicant further enclose two abstracts from a well known German-language reference book, i.e Rompp (1. Rompp Biotechnologie; 2. Rompp Online) and a translation of the highlighted passage that give an explanation of the term “matrix inclusion”.

Accordingly, Applicant requests the Examiner to withdraw the rejection under 35 USC §112, second paragraph.

Claim Rejections under 35 U.S.C § 102

Claims 1, 14 and 15 are rejected under 35 USC §102(b) as being anticipated by Surareungchai et al.

Applicant respectfully submit that Claim 1 has been cancelled in a preliminary amendment filed on July 29, 2002. Therefore, this rejection is rendered moot.

As the Examiner is aware, for a rejection under 35 USC §102(b) the prior art reference

should disclose each and every element of the present claim. Applicant respectfully submits that the Surareungchai et al reference does not teach or disclose each and every element of the claim.

In Particular, the Surareungchai et al teaches immobilization of glucose oxidase on an electrode, wherein the glucose oxidase and 1,3 DAB in a phosphate buffer are applied onto the electrode and subsequently subjected to electropolymerization (Page 9, 2nd column). Applicant respectfully submits that the Surareungchai et al reference does not teach or disclose “ wherein the at least second enzyme is immobilized by crosslinking, covalent bonding or matrix inclusion” as required by Claim 14 or “wherein the at least second enzyme is immobilized by glutardialdehyde” as required by Claim 15. Accordingly, since the the Surareungchai et al reference does not disclose each and every element of the claim, the rejection under 35 USC §102(b) is improper. Accordingly, the Applicant requests the Examiner to withdraw the rejection under 35 USC §102(b).

Claim Rejections under 35 U.S.C § 103

Claims 10 to 18 have been rejected under 35 USC §103(a) as being unpatentable over Okahata et al. in view of Sirkir et al., Armstrong et al and Cozzette et al. (US 5,837,454).

As the Examiner is aware, to establish a *prima facie* case of obviousness, three basic criteria must be met. First, there must be some suggestion or motivation, either in the references themselves or in the knowledge generally available to one of ordinary skill in the art, to modify the reference or to combine reference teachings. Second, there must be a reasonable expectation of success. Finally, the prior art reference (or references when combined) must teach or suggest all the claim limitations. The teaching or suggestion to make the claimed combination and the reasonable expectation of success must both be found in the prior art and not based on applicant's disclosure. *In re Vaeck*, 947 F.2d 488, 20 USPQ2d 1438 (Fed. Cir. 1991). MPEP §706.02 (j).

Applicant respectfully submits that the Okahata et al reaches a glucose oxidase sensor, wherein the glucose oxidase is immobilized on a platinum electrode by way of a Langmuir-Blodgett film. The transfer on to the electrode is carried out with an enzyme complex forming a stable monolayer on a water subphase. For stabilization on the water subphase, the enzyme is coupled with an amphiphile e.g. a non-ionic tenside, prior to transfer (see Abstract). Therefore,

the tenside is applied in form of a complex with the enzyme as opposed to a separate substance in an aqueous solution.

Additionally, the purpose of the invention in the Okahata et al is for the enzyme-lipid complex to overcome the problems arising in the preparation of stable monolayer of water soluble proteins on a water subphase because of their solubility in the subphase and to prevent their easy denaturation at the air-water interface (see p.65, first paragraph).

Therefore, Okahata et al reference does not provide any teachings, suggestion or motivation for the skilled person to apply an enzyme together with one or more surface active substances in an aqueous solutions to an electrode to achieve short response time and greater signal heights.

In view of the above, Applicant request the Examiner to withdraw the rejection under 35 USC §103(a).

Allowable Subject matter

Applicant thanks the Examiner for allowing Claim 19-22.

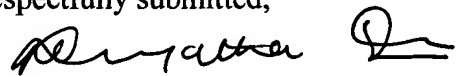
Conclusion

Applicant has filed a complete response to the outstanding office action. Applicant submits that all the claims are now in allowable form. In view of the above, Applicant request the Examiner to withdraw all rejections. If a personal conversation will expedite the prosecution of this application, the Examiner is requested to call the undersigned at 317-521-2851.

The Examiner is hereby authorized to charge Deposit Account No. 02-2958 for any fees associated with the filing of this Amendment. A duplicate copy of this sheet is enclosed.

Date: JULY 8th, 04

Respectfully submitted,


Sujatha Subramaniam, Reg. No. 48,739
Roche Diagnostics Corporation
9115 Hague Road, Bldg. D
Indianapolis, IN 46250-0457
Telephone No.: (317) 521-2851
Facsimile No.: (317) 521-2883

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



CREATININE BIOSENSOR

TECHNICAL FIELD

[0001] This invention relates to a method for producing biosensors comprising at least two enzymes, for the amperometric determination of enzymatically degradable substances in biological liquids, the enzymes being immobilized on a working electrode. Furthermore, the invention relates to a biosensor, in particular for the determination of creatinine.

Deleted: WO 01/87300

Deleted: PCT/AT01/00138

Formatted: Font: Bold

Formatted: Centered

Formatted: Font: Bold, Underline

Deleted: The

Formatted: Numbered + Level: 1 +
Numbering Style: 01, 02, 03, ... +
Start at: 1 + Alignment: Left +
Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99"
+ Indent at: 0.99", Tabs: Not at
0.99"

BACKGROUND

[0002] The determination of enzymatically degradable substances, such as creatinine, glucose etc., by means of sensors in biological liquids, for example in blood, urine, plasma, serum and liquor, is preferably carried out via biosensors comprising immobilized enzymes. From the literature, several electrochemical and photometric methods of determining those substances are known.

Formatted: Font: Bold

Formatted: Numbered + Level: 1 +
Numbering Style: 01, 02, 03, ... +
Start at: 1 + Alignment: Left +
Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99"
+ Indent at: 0.99"

[0003] Similarly, creatinine may be potentiometrically determined, for example by means of the enzyme creatinine deiminase, involving a subsequent determination of the ammonium content. Another method consists in determining the creatinine concentration by means of an enzyme cascade using the enzymes creatininase, creatinase and sarcosine oxidase, with hydrogen peroxide (H_2O_2) being finally measured at an amperometric electrode.

Deleted: In that way

[0004] This invention relates to a method for producing biosensors that function in accordance with the last-mentioned principle. In doing so, the enzymes must be coimmobilized in order to allow for the conversion of creatinine to the amperometrically detectable molecule hydrogen peroxide. The conversion of creatinine to hydrogen peroxide is carried out according to the following reaction steps:

Deleted: The

Deleted: invention

creatinine + H_2O	— creatininase →	creatinine
creatinine + H_2O	— creatinase →	sarcosine + urea
sarcosine + O_2 + H_2O	— sarcosine oxidase →	glycine +
formaldehyde + H_2O_2		

Formatted: Indent: Left: 0.49",
First line: 0.49"

Formatted: Indent: Left: 0.98"

[0005] At the amperometric electrode, hydrogen peroxide is oxidized anodically against Ag/AgCl at -350mV. The current flowing thereby is proportional to the creatinine concentration.

Formatted: Numbered + Level: 1 +
Numbering Style: 01, 02, 03, ... +
Start at: 1 + Alignment: Left +
Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99"
+ Indent at: 0.99"

H_2O_2 -350mV → 2 protons + 2 electrones + O_2

[0006] The oxygen recovered during the electrode reaction is then used for the oxidation of the sarcosine.

[0007] In the state of the art, various ways of immobilizing the three enzymes used are known. According to T. Tsuchida, K. Yoda, Clin. Chem. 29/1, p.51, 1983, all three enzymes are cross-linked with glutardialdehyde.

[0008] However, that sensor produced in such a manner discussed in the above cited reference has numerous drawbacks, only a low signal height is reached, i.e. only a slight change in current is ascertainable since the sarcosine oxidase immobilized in that manner loses almost its entire activity. However, a greatest possible signal height is particularly important especially for the determination of creatinine, since the concentration of creatinine is very small, especially in blood (approximately 50 μM), and, in addition, creatinase is available only with very small specific activities (20 iu/mg at the most). Furthermore, a sensor immobilized in such a manner exhibits long response times.

[0009] In US-A-5,466,575, a method is described in which sarcosine oxidase and creatininase are immobilized in a fish gelatin capable of being subjected to light-induced crosslinking and subsequently are superimposed by creatinase in a film-forming polyvinyl-acetate-co-vinyl-alcohol latex. However, one major drawback with this method is the production of the biosensor is very complicated due to light-induced crosslinking.

SUMMARY

[0010] The object of the invention is to provide a method of the initially mentioned kind which overcomes the above-mentioned drawbacks and difficulties. In particular, the method according to the invention is to allow for a simple production of a biosensor with which both short response times and great signal heights are achievable. In particular, immobilizing the enzymes at room temperature is to be possible.

[0011] According to the invention, that object is achieved in that an enzyme together with one or more surface-active substances in an aqueous solution is applied on the working electrode and is allowed to dry, and the at least second enzyme is chemically immobilized thereupon in a subsequent step.

Formatted: Indent: Left: 0.25", First line: 0.49"

Formatted: Numbered + Level: 1 + Numbering Style: 01, 02, 03, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99" + Indent at: 0.99"

Deleted: used

Deleted: that method of immobilization entails the drawback that

Deleted: , by means of a sensor produced in such a manner

Deleted: In this connection, however, the complicated light-induced crosslinking which prevents a simple production of the biosensor constitutes a drawback

Formatted: Font: Bold

Formatted: Numbered + Level: 1 + Numbering Style: 01, 02, 03, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99" + Indent at: 0.99"

DETAILED DESCRIPTION

[0012] For the purposes of the present description and patent claims, the term "surface-active substances" is to cover substances which possess surface-active characteristics, such as detergents and alcohols, for example glycerine.

[0013] Preferably, polyalcohols and/or detergents, preferably non-ionic tensides, are used as surface-active substances.

[0014] It has been found out that, by means of those additives, the measured current is increased by a factor of about 40 in comparison to biosensors comprising three equally immobilized enzymes.

[0015] Suitably, the at least second enzyme is immobilized by means of crosslinking, covalent binding or matrix inclusion. Preferably, immobilization is brought about by glutardialdehyde.

[0016] In a preferred embodiment, a cover membrane is applied after immobilization of the enzymes. Such a membrane consisting, for example, of nafion, PVC copolymer or cellulose acetate advantageously increases the linearity of the sensors and, in addition, causes a reduction of interfering influences.

[0017] A biosensor according to the invention which comprises a working, a reference and a counter electrode and whose enzymes have been immobilized by means of the method according to the invention is characterized in that the reference electrode is an Ag/AgCl electrode, the counter electrode is a carbon electrode, the working electrode consists of carbon, metal, metal oxides or a mixture of carbon and metal or metal oxides and the electrodes are applied on a nonconducting substrate.

[0018] In particular, a biosensor according to the invention for the determination of creatinine is characterized in that sarcosine oxidase is adsorbed on the working electrode and creatininase and creatinase are immobilized thereupon.

[0019] In a preferred embodiment, the biosensor is made up of two three-electrodes systems, the first electrode system comprising the enzymes creatininase, creatinase and sarcosine oxidase and serving for the determination of the sum of creatinine and creatine and the second electrode system comprising the enzymes creatinase and sarcosine oxidase and serving for the determination of creatine, whereby the result of the second electrode system is deducted from the result of the first one for the determination of creatinine.

Formatted: Font: Bold

**Formatted: Numbered + Level: 1 +
Numbering Style: 01, 02, 03, ... +
Start at: 1 + Alignment: Left +
Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99"
+ Indent at: 0.99"**

[0020] Advantageously, the biosensor comprises a further electrode system serving for the elimination of electrochemical interferences.

[0021] In the following, the invention is explained further by the aid of the following examples:

Example 1

[0022] Example 1 shows the improvement of the signal height by increasing the activity of the sarcosine oxidase when adding, in accordance with the invention, surface-active substances, as opposed to the prior art.

[0023] Sarcosine oxidase dissolved in water (prior art) as well as in water with water-soluble, surface-active components (in the instant case, glycerine as well as three non-ionic tensides) being added was dropped onto the amperometric base sensor and was allowed to dry at room temperature. Upon polarization of the electrode, the current was measured on 1 mM sarcosine. The measuring result is shown in Table 1.

Table 1

Sarcosine oxidase (SOx)	Additive	Current on 1 mM sarcosine
54.2 mg SOx in 0.5 ml H ₂ O	none	2 nA
54.2 mg SOx in 0.5 ml H ₂ O	5.0% glycerine	80 nA
54.2 mg SOx in 0.5 ml H ₂ O	0.5% Tween 20	70 nA
54.2 mg SOx in 0.5 ml H ₂ O	0.5% Triton X100	90 nA
54.2 mg SOx in 0.5 ml H ₂ O	0.5% Brij 35	85 nA

[0024] It was found that the current on 1 mM sarcosine could be increased by a factor of about 40 by means of detergents or glycerine, respectively.

[0025] Apparently, that enormous increase in current has been achieved since, during drying, the enzyme is protected in the best possible way by the additives and since the surface-active characteristics of the additives result in a better and closer bonding with the porous texture of the hydrogen peroxide electrode.

Example 2

[0026] Example 2 shows the improvement of the signal height as well as the shortening of the response time of a biosensor according to the invention in comparison to a biosensor produced in accordance with the prior art (T. Tsuchida).

[0027] Two complete creatinine sensors were produced, whereby, in case of the first sensor, all three enzymes together were cross-linked with glutardialdehyde and, in case of the second sensor, sarcosine oxidase with

Formatted: Indent: Left: 0.25",
First line: 0.49"

Formatted: Numbered + Level: 1 +
Numbering Style: 01, 02, 03, ... +
Start at: 1 + Alignment: Left +
Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99"
+ Indent at: 0.99"

Formatted: Numbered + Level: 1 +
Numbering Style: 01, 02, 03, ... +
Start at: 1 + Alignment: Left +
Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99"
+ Indent at: 0.99"

Formatted: Indent: Left: 0.25",
First line: 0.49"

Formatted: Numbered + Level: 1 +
Numbering Style: 01, 02, 03, ... +
Start at: 1 + Alignment: Left +
Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99"
+ Indent at: 0.99"

Tween 20 was first applied on the base electrode and subsequently creatininase and creatinase were immobilized thereupon with glutardialdehyde. The resulting currents and response times, respectively, for measuring creatinine as well as sarcosine are listed in Table 2.

Table 2

Sarcosine oxidase	Current on 1 mM creatinine	Current on 1 mM sarcosine	Response time (T90)
in glutardialdehyde (sensor 1)	120 nA	140 nA	80 s
in Tween 20 (sensor 2)	420 nA	>500 nA	10 s

[0028] By means of the immobilization according to the invention of the enzymes, a by far stronger current was measured. The response time of the sensor produced according to the invention was also clearly shorter than that of the sensor known in the prior art.

Formatted: Numbered + Level: 1 + Numbering Style: 01, 02, 03, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99" + Indent at: 0.99"

Example 3

[0029] In example 3, the production of a creatinine biosensor according to the invention is described.

Formatted: Indent: Left: 0.25", First line: 0.49"

[0030] By means of the serigraphy process, Ag-strip conductors for reference, counter and working electrodes were printed on an electrically nonconducting substrate made of a synthetic or ceramic material. The reference electrode is produced from an Ag/AgCl-paste at least in the sensor area. A layer of carbon paste is printed on the counter electrode within its measuring area. By means of the same carbon paste, the Ag-strip conductor of the working electrode is extended into the measuring area. In the measuring area of the working electrode, a mixture of 5% manganese dioxide in carbon paste is printed as a working electrode. Subsequently, the entire system with the exception of the electrode spots lateron to be contacted with a liquid and the strip conductors serving for the signal tap is repeatedly coated with an insulating varnish. Following that, sarcosine oxidase in a Tween 20 solution is dropped onto the working electrode and is allowed to dry. Thereupon, the other enzymes are immobilized by means of glutardialdehyde. In order to increase linearity and to reduce interfering influences, a cover membrane is applied.

Formatted: Numbered + Level: 1 + Numbering Style: 01, 02, 03, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99" + Indent at: 0.99"

[0031] In order to be able to determine creatinine without any interferences, at least two three-electrodes systems are necessary; one system comprising the enzymes creatininase, creatinase and sarcosine oxidase which determines

creatinine and creatine as well another one comprising the enzymes creatinase and sarcosine oxidase which serves for the determination of creatine. Since creatine acts as an interfering substance in blood, the measured creatine value has to be deducted from the measured value of the creatinine electrode, which is composed of creatine and creatinine.

[0032] In order to eliminate further electrochemical interferences, a third electrode system may be used solely with immobilized sarcosine oxidase (creatine is replaced by an inactive protein, for example albumin).

Formatted: Normal, Numbered + Level: 1 + Numbering Style: 01, 02, 03, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0.74" + Tab after: 0.99" + Indent at: 0.99"

[0033] It is noted that terms like "preferably", "commonly", and "typically" are not utilized herein to limit the scope of the claimed invention or to imply that certain features are critical, essential, or even important to the structure or function of the claimed invention. Rather, these terms are merely intended to highlight alternative or additional features that may or may not be utilized in a particular embodiment of the present invention.

[0034] Having described the invention in detail and by reference to specific embodiments thereof, it will be apparent that modifications and variations are possible without departing from the scope of the invention defined in the appended claims. More specifically, although some aspects of the present invention are identified herein as preferred or particularly advantageous, it is contemplated that the present invention is not necessarily limited to these preferred aspects of the invention.

Formatted: Indent: Left: 0.74"

Deleted: Claims:

1. A method for producing biosensors comprising at least two enzymes, for the amperometric determination of enzymatically degradable substances, such as creatinine, in biological liquids, the enzymes being immobilized on a working electrode, characterized in that an enzyme together with one or more surface-active substances in an aqueous solution is applied on the working electrode and is allowed to dry, and the at least second enzyme is chemically immobilized thereupon in a subsequent step.
2. A method according to claim 1, characterized in that polyalcohols and/or detergents, preferably non-ionic tensides, are used as surface-active substances.
3. A method according to claim 1 or 2, characterized in that the at least second enzyme is immobilized by means of crosslinking, covalent binding or matrix inclusion.
4. A method according to claim 3, characterized in that the at least second enzyme is immobilized by means of glutardialdehyde.
5. A method according to any of claims 1 to 4, characterized in that a cover membrane is applied after immobilization.
6. A biosensor comprising a working, a reference and a counter electrode, produced by means of the method according to any of claims 1 to 5, characterized in that the reference electrode is an Ag/AgCl electrode and the counter electrode is a carbon electrode and the working electrode consists of carbon, metal, metal oxides or a mixture of carbon and metal or metal oxides, the electrodes being applied on a nonconducting substrate.
7. A biosensor according to claim 6 for the determination of creatinine, characterized in that sarcosine oxidase is adsorbed on the working electrode and creatinase and creatinase are immobilized thereupon.
8. A biosensor according to claim 7, characterized in that it is made up of two three-electrodes systems, the first electrode system comprising the enzymes creatinase, creatinase and sarcosine oxidase and serving for the determination of the sum of creatinine and creatine and the second electrode system comprising the enzymes creatinase and sarcosine oxidase and serving for the determination of creatine, whereby the two results are subtracted for the determination of creatinine.
9. A biosensor according to claim 8 which comprises a further electrode system serving for the elimination of electrochemical interferences.

Formatted: Centered

ABSTRACT

The present invention generally relates to a method for producing biosensors and a biosensor for determination of creatinine. The biosensor comprises at least two enzymes, for the amperometric determination of enzymatically degradable substances in biological liquids, the enzymes being immobilized on a working electrode.

allg.: CRC Crit. Rev. Biotechnol. 1, 21 (1983) • Gow et al., SCP Production from Methanol: Bacteria, in Tannenbaum u. Wang (Hrsg.), Single Cell Protein II, S. 370, Cambridge, MA: MIT Press 1976 • Science 219, 740 (1983) • Stringer, ICI Protein: Manufacture, Characteristics, Toxicology, and Nutritional Properties, Billingham: ICI report 1975.

5,8,11,14-Icosatetraensäure s. Arachidonsäure.

Idiophase (von griech.: idios = eigen-, eigentümlich). Die Fermentationsphase, in der *Sekundärmetabolite bevorzugt gebildet werden. In *Batch-Fermentationen mit leicht metabolisierbaren Kohlenstoff- u. Stickstoff-Quellen ist dies der Fermentationsabschnitt nach Abschluß der *logarithmischen Wachstumsphase (in diesem Fall auch *Trophophase genannt). Sekundärmetabolite werden daher auch als *Idiolite* bezeichnet. In allen bisher untersuchten Fällen sind die am Sekundär-Metabolismus beteiligten zusätzlichen Enzyme während der Trophophase reprimiert¹. Daran können verschiedene Mechanismen der *Regulation beteiligt sein wie: Verlangsamung des Wachstums durch den Verbrauch essentieller Nähr- od. Mineralstoffe; Kohlenstoff- od. Stickstoff-*Katabolit-Repression; Phosphat-Mangel im Medium; zelleigene Autoregulation; *Enzyminduktion u. -repression; *Endprodukthemmung usw.². Zu den typ. Fermentationen mit einer Trophophase u. einer I. zählen Verf. zur Herst. von *Antibiotika, *Alkaloiden, Oligopeptiden, Polyketiden, Steroiden, *Terpenen usw. – *E* = *F* idiophase – *I* = *S* idiofase
Lit.: ¹Crueger u. Crueger, Biotechnologie – Lehrbuch der angewandten Mikrobiologie, München: Oldenbourg 1989; Dellweg, S. 144, 156. ²Rehm-Reed 4, 19–38.
allg.: Bu'Lock, The Biosynthesis of Natural Products, New York: McGraw-Hill 1965 • J. Appl. Chem. Biotechnol. 22, 79 (1972).

IEF s. isoelektrische Fokussierung.

IgA. Abk. für *Immunglobuline der Klasse A, sind in erster Linie in Sekreten u. auf Schleimhäuten lokalisiert u. spielen eine bes. Rolle bei der lokalen Abwehr von Infektionserregern. IgA kommt in monomerer od. dimerer Form vor. Beim Menschen existieren zwei IgA-Subklassen; weitere Eig. s. bei Immunglobuline.

IgD. Abk. für *Immunglobuline der Klasse D, sind als Antigen-Rezeptoren an der Oberfläche von Prä-B-Lymphocyten lokalisiert u. spielen hier eine Rolle bei der Differenzierung von *B-Lymphocyten. Im Serum kommt IgD nur in geringer Konz. vor; weitere Eig. s. bei Immunglobuline.

IgE. Abk. für *Immunglobuline der Klasse E (Synonym *Reagin*), sind für atop. allerg. Reaktionen (s. Allergie) verantwortlich u. spielen wahrscheinlich unter normalen Bedingungen eine Rolle bei der Parasitenabwehr; weitere Eig. s. bei Immunglobuline.

IgG. Abk. für *Immunglobuline der Klasse G, stellen mengenmäßig den Hauptanteil der *Antikörper der Säugetiere (einschließlich des Menschen) dar. Sie treten in erster Linie im Serum, aber auch in anderen Körperflüssigkeiten auf. Vom IgG der verschiedenen Säugetiere sind unterschiedliche Subklassen bekannt.

IgG ist in der Lage, die Plazenta zu passieren, Antikörper dieser Klasse stellen somit einen passiv übertragenen Schutz der Neugeborenen gegenüber Infektionserregern dar; weitere Eig. s. bei Immunglobuline.

IgM. Abk. für *Immunglobuline der Klasse M, kommen als Pentamere vor. Sie stellen phylogenet. die ursprünglichsten Immunglobuline dar u. treten auch im Laufe der Ontogenese als erste auf; weitere Eig. s. bei Immunglobuline.

IL-2 s. Interleukine.

Ile. Drei-Buchstaben-Code für die *Aminosäure *Isoleucin.

Imhoff-Trichter. Bez. für ein kon. Sedimentierglas nach DIN 12 672 zur Best. des Volumenanteils der absetzbaren Stoffe in Wasser u. Abwasser. Der I.-T. weist ein Vol. von 1 Liter auf u. ist am unteren Teil mit einer Meßskala versehen. Gemessen wird das Vol. der absetzbaren Stoffe in ml/l nach 2 Std. Absetzzeit. Die untere Meßgrenze liegt bei 0,1 ml/l. Die Messung dient in erster Linie zur Überwachung klärtechn. Maßnahmen. Der Volumenanteil der absetzbaren Stoffe ist fernerhin eine der Maßzahlen zur Ermittlung der Abgabe laut *Abwasser-Abgabengesetz (AbwAG). – *E* Imhoff cone – *F* cone Imhoff – *I* imbuto Imhoff – *S* cono de Imhoff

Lit.: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, H 9, Weinheim: Verl. Chemie 1981.

Imipenem (Impemide, MK-0787, NK 787). Semisynthet. N-Formimidoyl-Deriv. des Thienamycin (s. dort) mit einer die klin. Anw. zulassenden Stabilität. – *E* = *I* = *S* imipenem – *F* imipenem

Immobilisierte Biokatalysatoren. Umfassende Bez. für alle Arten von enzymat. akt. Materialien (Mikroorganismen, höhere pflanzliche u. tier. Zellen, Zellgewebe, Zellorganellen od. isolierte Enzyme), die auf künstlichem Wege in eine katalyt. akt., unlösl. Form gebracht wurden. I. B. werden eingesetzt für analyt., diagnost., präparative od. industrielle Zwecke. Enzyme, die in vivo an Membranen gebunden sind, fallen nicht unter diesen Begriff u. werden definitionsgemäß als „nativ“ bezeichnet.

Meth.: 1. *Adsorption* an inerten od. an elektr. geladenen, anorg. od. org. Trägermaterialien. Tab. 1 zeigt eine Auswahl von möglichen Trägern.

Tab. 1: Trägermaterialien zur Immobilisierung von Biokatalysatoren.

anorganische Materialien	natürliche Polymere	synthetische Polymere
poröse Gläser	Cellulose	Polyacrylamid
Silicagel	Stärke	Polyvinylalkohol
Aluminiumoxid	*Dextran	Methylacrylat
Bentonit	Alginate	Nylon
*Hydroxylapatit	Agarose	Oxirane
verschiedene Metalloxide	*Carrageen	
	Collagen	

Die Immobilisierung erfolgt durch physik. Bindungskräfte (*Van-der-Waals-Kräfte), oft unter Beteiligung

von *hydrophoben Wechselwirkungen u. ion. Bindungen. Diese Meth. sind einfach u. haben nur geringen Einfluß auf die *Konformation der i. Biokatalysatoren. Nachteilig ist die meist schwache Bindung u. die Gefahr der Desorption, bes. bei Änderung von Substrat- od. Ionen-Konzentration. Durch elektrost. Bindungskräfte zwischen geladenen Gruppen der Protein-Mol. u. dem Träger kann die Bindung der i. B. wesentlich verbessert werden, z. B. durch Verw. von *Ionenaustauschern (z. B. *DEAE-Cellulose od. *Sephadex® u. ä.). Die Verw. von DEAE-Cellulose, beladen mit *Aminoacylase für die Racemat-Spaltung von Aminosäuren im techn. Maßstab wurde bereits 1969 beschrieben¹.

2. *Kovalente Bindung an Trägermaterialien.* Die Träger müssen dazu reaktive Gruppen aufweisen, die mit Aminosäure-Seitenketten homöopolare Bindungen eingehen können. Geeignete Gruppen in Proteinen sind Carboxy-, Hydroxy- u. Sulfid-Gruppen, u. insbes. die endständige Amino-Gruppe von Lysin. Aromat. Aminosäuren bieten die Möglichkeit für Diazo-Kupplungen. Die Oberfläche von porösen Gläsern kann durch Behandlung mit Silanen (z. B. Aminoalkylethoxysilan) aktiviert u. anschließend mit Proteinen umgesetzt werden. Hydroxy-Gruppen natürlicher Polymere können mit *Bromcyan, Carboxy-Gruppen mit Thionylchlorid aktiviert u. anschließend mit Enzymen gekoppelt werden. Mit Oxiran-Gruppen substituierte Polyacrylamid-Harze, die im Handel erhältlich sind, können direkt mit Enzymen kovalente Bindungen eingehen. Insgesamt stehen zahlreiche unterschiedliche Meth. zur Verfügung. Sie sind in erster Linie für Enzyme geeignet, aber auch Zellen u. Zellorganellen können auf diese Weise immobilisiert werden.

3. *Einschluß in dreidimensionale Netzwerke (E matrix entrapment)* ist die wohl am häufigsten verwendete Meth. für i. Biokatalysatoren. Dabei wird die Polymerisation bzw. die Gelatinisierung in wäss. Lsg. in Ggw. des Biokatalysators durchgeführt. Im einfachsten Fall (Gelatine, Agar) wird das Polymer zuerst in Wasser heiß-gelöst, anschließend nach dem Erkalten mit einer Lsg. bzw. Suspension des Biokatalysators gemischt u. tropfenweise in eine eiskühle Pufferlsg. eingetragen. Ionotrope Gele (*Carrageen bzw. *Alginsäure) werden durch Eintropfen in Salzlsg. erhalten (KCl bzw. CaCl₂). Andere Meth. sind Lsgm.-Fällung (mit Celluloseacetat od. Polystyrol) od. Polykondensation (Epoxyharze, Polyurethane) od. Polymerisation der lösl. Monomeren (Polyacrylamid) in Ggw. des Biokatalysators. Sie alle eignen sich für Enzyme u. intakte Zellen gleichermaßen. Von Vorteil ist, daß die Biokatalysatoren innerhalb des Netzwerkes in freier, nicht gebundener Form vorliegen. Die Poren der Matrix müssen klein genug sein, um die i. B. zurückzuhalten. Für den Transport von Substrat- u. Prod.-Mol. bedeutet dies jedoch eine erhebliche *Diffusionsbehinderung u. für makromol. Substrate sind diese i. B. nicht einsetzbar. Für den techn. Einsatz ist die Kompressibilität der Partikel von entscheidender Bedeutung. Im *Festbettreaktor müssen sie ausreichend formstabil sein, da andern-

falls bei höheren hydrostat. Drücken zu hohe Druckverluste in der Säule auftreten.

4. *Quervernetzung (E cross linking).* Dabei werden die Biokatalysatoren durch Vernetzung mit bifunktionellen Agentien [Benzidin, Diiso(thio)cyanate, Glutaraldehyd, Epichlorhydrin u. ä.] in polymere Aggregate umgewandelt. Diese i. B. sind aber zumeist gelatinös u. leicht verformbar, d. h. also nur für den Einsatz in durchströmten Rührreaktoren od. Fließbettreaktoren geeignet. Durch Zugabe anderer, inakt. Komponenten (Gelatine, Albumin usw.) bei der Vernetzung können die mechan. u. enzymat. Eig. wesentlich verbessert werden. Ein Nachteil dieser Meth. ist allerdings die relativ geringe spezif. Enzymaktivität, da die im Inneren der Partikel eingeschlossenen Biokatalysatoren für das Substrat nicht zugänglich sind.

5. *Mikroverkapselung (E microencapsulation).* Diese Meth. stellt einen Sonderfall der Verf. dar, die eine Eingrenzung des Reaktionsraumes von Biokatalysatoren mit Hilfe von *Membranen zum Ziel haben. *Mikrokapseln (übliche Durchmesser zwischen 1 u. 100 µm) sind bisher für ganze Zellen noch nicht u. für Enzyme nur selten eingesetzt worden. Die Mikroverkapselung kann als Grenzflächen-Polymerisation (s. Koazervation) durchgeführt werden. Dazu wird eine Biokatalysator-Lsg., zus. mit einem hydrophilen Monomer in einem org., mit Wasser nicht mischbaren Lsgm. zu kleinen Tröpfchen dispergiert. Gibt man dann ein hydrophobes Monomer dazu, das sich in der org. Phase löst, dann findet an der Grenzfläche der beiden Phasen eine Polymerisation statt u. es kommt zur Bldg. von Mikrokapseln, in denen die Biokatalysatoren (gelöst od. suspendiert) eingeschlossen sind. Statt in festen Mikrokapseln können Biokatalysatoren auch in verformbaren, fluiden Lipidmembranen verpackt werden, die dann mit natürlichen Zellen vergleichbar sind. Diese Meth. wird als *Liposomen-Technik* bezeichnet (s. Lipide, Liposomen). Durch Ultraschall-Behandlung wäss. Lsg. von *Phospholipiden findet eine Aggregation zu Lipid-Doppelschichten statt, die zur Entstehung von *Micellen führen, mit hydrophilen inneren u. äußeren Oberflächen. In solche Liposomen eingeschlossene Enzyme können für medizin.-therapeut. Zwecke nützlich sein, sowie zum Studium natürlicher Membransysteme. Eine Eingrenzung des Aktionsraumes von Biokatalysatoren durch makroskop. Membransyst. liegt bei den zahlreichen Varianten von *Membranbioreaktoren vor, bei denen die katalyt. Reaktion durch *Ultrafiltrationsmembranen auf ein Teilvol. begrenzt wird, während der übrige Reaktorraum zum Transport kleiner, leicht diffundierender Substrat- u. Prod.-Mol. dient (s. Hohlfaserreaktor, Enzym-Membranreaktor). Erwähnung verdient noch die *Co-Immobilisierung* von mehreren verschiedenen Biokatalysatoren an einer Träger-Matrix od. von Enzymen einschließlich ihrer *Coenzyme, um die diffusiven Transportwege von Prod. bzw. Coprod. zu verkürzen. *Prozesse:* Für die Auswahl der *Reaktoren* sind neben der Beschaffenheit u. den Eig. der i. B. auch enzymkinet. Aspekte zu berücksichtigen. Für Reaktionen mit

ausgesprochener *Substrathemmung wird man bevorzugt kontinuierlich durchströmte Rührkessel-Reaktoren od. *Mehrstufen-Rührreaktoren einsetzen, für Umsetzungen, die durch das Prod. gehemmt werden, v.a. *Säulenreaktoren. Je nach der Wertschöpfung u. den Betriebskosten des Prozesses kann der relative Anteil der Katalysator-Kosten zwischen <1% u. 50% liegen. Daher kann neben der Wiederverw. des Katalysators auch der wiederholte Einsatz des Trägers von Bedeutung sein. Anorg. Träger können dabei rigorosen Reinigungsschritten unterworfen werden, org. Materialien unterliegen in dieser Hinsicht Beschränkungen. Bei ionogen od. adsorptiv gebundenen Enzymen kann die im Prozeß durch Desorption verlorene Aktivität oft durch einfaches Nachspülen mit Enzym-Lsg. wieder regeneriert werden. Die Effektivität eines Katalysators u. seine Stabilität (HWZ) unter Betriebsbedingungen gehen ebenso in die Wirtschaftlichkeits-Berechnung ein wie die Prod.- u. Substrat-Kosten. In manchen Fällen kann eine unvollständig ablaufende Umsetzung wirtschaftlicher sein, als eine mit 100% Ausbeute.

Immobilisierte Mikroorganismen: Für Ein-Enzym-Reaktionen kann gegebenenfalls auf die Isolierung des Enzyms verzichtet werden. Man kultiviert Zellen unter Bedingungen, unter denen sie möglichst hohe Enzymaktivitäten haben u. benutzt die inakt. Zellen nach geeigneter Copolymerisation (z. B. Zugabe eines neutralen Proteins u. Vernetzung mit Glutardialdehyd) direkt als i. Biokatalysatoren. Enzyme haben in diesem, ihrem natürlichen Mikro-Milieu oft höhere Stabilitäten u. Aktivitäten als isolierte Enzyme. In anderen Fällen hat sich der Einschluß von vitalen Zellen in Polymere (z. B. Carrageen) bewährt; durch Inkubation dieser i. B. in einem geeigneten Nährmedium unter Wachstumsbedingungen erreicht man dann eine hohe Zellvermehrung innerhalb der Partikel. Diese können dann für den eigentlichen Prozeß (z. B. *alkoholische Gärung) eingesetzt u. gegebenenfalls durch erneute Inkubation auch wieder regeneriert werden. Eine weitere Variante bieten *photovernetzbar Polymere: Eine Mikroorganismen-Suspension mit den lösl. *Präpolymeren wird in dünner Schicht durch Bestrahlung mit einer Tageslicht-Lampe polymerisiert, u. die erhaltenen, katalyt. akt. Folien können für zahlreiche denkbare Prozesse (*Biotransformationen od. in Membranreaktoren) eingesetzt werden.

Immobilisierte Säugerzellen: Mit *Rollerflaschen u. *Mikrocarrier-Kulturen werden bei der in vitro Kultivierung von tier. Zellen (s. Tierzellkulturen) Zellen an Feststoffen (Träger) immobilisiert. Die an die Mikrocarrier anhaftenden Zellen bewachsen die Trägeroberfläche bis zur geschlossenen Einzell-Schicht (*E monolayer*). Die Anw. von Mikrocarriern in einfacher Suspension od. im Packbett führt zu Zelldichten bis zu einigen Mio. Zellen pro ml (Verglichen mit der klass. Rollerflaschenmeth. ist die Zelldichte etwa um den Faktor 50 höher). Immobilisierte Säugerzellen werden zur Produktion großer Zellmengen, von Viren, Vakzinen u. therapeut. Proteinen wie *Interferonen, *Interleukinen u. TPA (s.

Plasminogene) genutzt, aber auch für Bioassays eingesetzt.

Immobilisierte Pflanzenzellen: Aufgrund ihres großen Biotransformations- u. Synth.-Potentials bes. für sek. Naturstoffe haben Pflanzenzellen ebenfalls gute Perspektiven bei der industriellen Anw. von i. Biokatalysatoren. Für die Synth. sek. Prod. sind komplizierte Stoffwechselketten erforderlich, die nur unter gleichzeitiger Erhaltung der Lebensfähigkeit der betreffenden Pflanzenzellen funktionsfähig bleiben. Die zur Immobilisierung vorgesehenen Pflanzenzellen stammen meist aus Zellkulturen (s. Pflanzenzellkulturen), die fast ausschließlich durch Einschluß in polymere Matrices polymerisiert werden.

Techn. Bedeutung: Die Verw. von i. B. im techn. Bereich beschränkt sich bisher auf 2 Enzyme (*Glucose-Isomerase u. Penicillin-Acylase); andere Prozesse sind im Vgl. dazu von geringer Bedeutung (s. Tab. 2, S. 388).

Gründe für die beschränkte techn. Nutzung von i. B. sind:

- die „groben Enzyme“ werden für den Abbau von Polymeren eingesetzt (Stärke, Pektine) od. als Waschmittelenzyme. Hierfür sind i. B. ungeeignet;
- die meisten techn. Enzyme sind so billig geworden, daß das Wegwerfen ökonom. ist als die Immobilisierung;

- viele potentielle Verf. mit i. B. sind noch zu teuer, um mit den Prozessen mit lösl. Enzymen konkurrieren zu können. – *E immobilized biocatalysts* – *F biocatalyseurs immobilisés* – *I biocatalizzatori immobilizzati* – *S biocatalizadores inmovilizados*

Lit.: ¹ *Agric. Biol. Chem.* 33, 1053–1059 (1969).
² *Rehm-Reed* 7b, 405–464.

allg.: Aguirre, *Immobilization as a Tool to Investigate the Function and Stability of Oligomer Enzymes*, München: Minerva 1982 • *Appl. Biochem. Bioeng.* 4 (1983) • Buchholz (Hrsg.), *Characterization of Immobilized Biocatalysts*, Weinheim: Verl. Chemie 1979 • Carr u. Bowers, *Immobilized Enzymes in Analytical Chemistry*, New York: Wiley 1980 • Chibata, *Immobilized Enzymes*, Tokyo: Kodansha 1978 • Chibata, Fukui u. Wingard (Hrsg.), *Enzyme Engineering*, Bd. 6, New York: Plenum Press 1982 • Godfrey u. Reichelt, *Industrial Enzymology*, London: Macmillan 1982 • Hartmeier, *Immobilisierte Biokatalysatoren*, Berlin: Springer 1986 • Laskin (Hrsg.), *Applications of Enzymes and Immobilized Cells to Biotechnology*, New York: Benjamin/Cummings Publ. 1985 • Linko u. Larinkari, *Enzyme Engineering in Food Processing*, Vol. 2, London: Appl. Science Publishers 1980 • Moo-Young 1–3 • Renneberg, *Bio-Horizonte*, Leipzig: URANIA 1990 • Weetall u. Royer (Hrsg.), *Enzyme Engineering*, Bd. 5, New York: Plenum Press 1980 • Wiseman (Hrsg.), *Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology*, Chichester: Ellis Harwood 1981 • Woodward (Hrsg.), *Immobilized Enzymes and Cells*, Oxford: IRL Press 1985.

Immobilisierte Enzyme. An Trägermaterial fixierte lösl. *Enzyme (s. immobilisierte Biokatalysatoren), die dadurch unlösl. gemacht u. wieder verwendbar werden. Nach einer Definition der European Federation of Biotechnology (1983) umfaßt der Begriff alle Enzyme, die sich in einem Zustand befinden, der ihre Wiederverw. erlaubt. I. E. sind gegenüber dem freien Enzym mit Vor- u. Nachteilen für Prod., Prozeß u. Anlage verbunden. Der entscheidende Vorteil der

In diesem Lexikon sind zahlreiche Gebrauchs- und Handelsnamen, Warenzeichen, Firmenbezeichnungen sowie Angaben zu Vereinen und Verbänden, DIN-Vorschriften, Codenummern des Zolltarifs, MAK- und TRK-Werten, Gefahrklassen, Patenten, Herstellungs- und Anwendungsverfahren aufgeführt. Alle Angaben erfolgten nach bestem Wissen und Gewissen.

Herausgeber und Verlag machen ausdrücklich darauf aufmerksam, daß vor deren gewerblicher Nutzung in jedem Falle die Rechtslage sorgfältig geprüft werden muß.

Die Deutsche Bibliothek – CIP-Einheitsaufnahme

Römpf Chemie Lexikon / Hrsg.: Jürgen Falbe und Manfred Regitz. Bearb. von zahlr. Fachkollegen. – Stuttgart ; New York : Thieme.

Bis 8. Aufl. u.d.T.: Neumüller, Otto-Albrecht:

Römpfs Chemie-Lexikon

NE: Römpf, Hermann [Begr.]; Falbe, Jürgen [Hrsg.]; Chemie-Lexikon

Römpf Lexikon Biotechnologie / Hrsg.: Hanswerner Dellweg ... Bearb. von zahlr. Fachkollegen. Zentralred.: Elisabeth Hillen. – Stuttgart ; New York : Thieme, 1992.

(Römpf Chemie Lexikon)

NE: Dellweg, Hanswerner [Hrsg.]; Römpf, Hermann [Begr.]; Lexikon Biotechnologie
Römpf Lexikon Biotechnologie, – 1992

Das Werk, einschließlich aller seiner Teile, ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

© 1992 Georg Thieme Verlag
Rüdigerstraße 14, D-7000 Stuttgart 30
Printed in Germany

Typographie: Brigitte und Hans Peter Willberg

Gesamtherstellung:
Konrad Triltsch GmbH
Graphischer Betrieb, 8700 Würzburg

Gedruckt auf säurefreies, archivierfähiges Werkdruckpapier, Permaplan, von Gebrüder Buhl Papierfabriken, Ettlingen und Dettingen.

ISBN 3-13-736401-9

2 3 4 5 6

Korrespondenzanschriften

Herausgeber:

Prof. Dr. Hanswerner Dellweg
Heiligendammer Str. 15
1000 Berlin 33

Prof. Dr. Rolf D. Schmid
Ges. für Biotechnologische
Forschung mbH
Bereich Enzymtechnik
u. Naturstoffe
Mascheroder Weg 1
3300 Braunschweig

Prof. Dr. Wolfgang E. Trommer
Universität Kaiserslautern
Fachbereich Chemie
Postfach 30 49, Geb. 54/581
6750 Kaiserslautern

Zentralredaktion:
Dr. Elisabeth Hillen
Georg Thieme Verlag
Rüdigerstr. 14
7000 Stuttgart 30

unter Mitarbeit von
Ute Rohlf
Tübingen
Dr. Barbara Frunder
Tübingen

Codenummern
des Zolltarifs (HS)
überarbeitet von:
Karl Kettner
Sigmaringen

Beilsteinzitate und
Nomenklatur
überprüft von:
Eva Hoffmann
Frankfurt am Main
Dr. Bruno Langhammer
Frankfurt

Übersetzung der Stichworte:

Englisch:
Durch die Autoren
Französisch:
Durch die Autoren
Italienisch:
Dipl. Chem. Salvatore Venneri
Ludwigshafen
Spanisch:
Dipl. Chem. Ricard Wilshusen
Darmstadt

Immobilisierte Biokatalysatoren

Fachgebiet Biotechnologie und Gentechnik, Unterthema Enzyme, Enzymtechnologie
Fachgebiet Lebensmittelchemie, Unterthema Enzyme

Umfassende Bez. für alle Arten von Biokatalysatoren, die auf künstlichem Wege in eine katalyt. aktive, unlösl. Form gebracht wurden. I. B. werden eingesetzt für analyt., diagnost., präparative od. industrielle Zwecke. Enzyme, die *in vivo* an Membranen gebunden sind, fallen nicht unter diesen Begriff.

Methode:

1. *Adsorption* an inerten od. an elektr. geladenen, anorgan. od. organ. Trägermaterialien. Tab. 1 zeigt eine Auswahl möglicher Träger.

Tab.1: Trägermaterialien u. Gele zur Immobilisierung von Biokatalysatoren (Auswahl).

anorgan. Materialien	natürliche Polymere	synthet. Polymere
poröse Gläser, SiO ₂	Cellulose	Polyacrylamid
Kieselgel, SiO ₂	Fibroin (Naturseide)	Polyvinylalkohol
Alumosilicate	Dextran	Polymethacrylat
Bentonit	Alginate	Polyamid, Nylon
poröse Keramik	Agarose	Polystyrol-Derivate
verschiedene Metalloxide	Carrageen	
Hydroxylapatit	Collagen	

Die Meth. sind einfach u. haben nur geringen Einfluß auf die Konformation der Biokatalysatoren. Nachteilig ist die meist schwache Bindung u. die Gefahr der Desorption, bes. bei Änderung der Substrat- od. Ionenkonzentration. Sind elektrost. Bindungskräfte involviert (*ion. Bindungsmeth.*), wird die Bindung der i. B. wesentlich verbessert, z. B. durch Verw. von Ionenaustauschern (z. B. DEAE-Cellulose od. -Sephadex®, synthet. Polystyrol-Harzen u. a.). Die Verw. von DEAE-Cellulose, beladen mit Aminoacylase, für die Racemat-Spaltung von Aminosäuren im techn. Maßstab wurde bereits 1969 beschrieben [1].

2. Zur *kovalenten Trägerbindung* müssen die Träger reaktive Gruppen aufweisen, die mit funktionellen Gruppen an der Oberfläche der Biokatalysatoren kovalente Bindungen eingehen können. Geeignete Gruppen in Proteinen sind Carboxy-, Hydroxy- u. Sulfid-Gruppen u. insbes. die endständige Amino-Gruppe von Lysin. Die Träger werden direkt od. indirekt (über bi- u. multifunktionelle Verb.) aktiviert. Die Meth. unterscheiden sich in Protein-Beladung, Kupplungsausbeute u. Einfluß auf die Aktivität der Biokatalysatoren. Durch längere Molekülketten (*E spacer*) kann der Abstand des Biokatalysators von der Trägeroberfläche vergrößert werden. Hydroxy-Gruppen von Polymeren können mit Bromcyan, *N*-Hydroxy-succinimidester, Carbonyldiimidazol, Chlortriazin, Thionylchlorid, Divinylsulfon, Chloressigsäure, Epoxiden,

Natriumperiodat, Tosyl- u. Tresylchlorid aktiviert werden, die Oberfläche von porösen Gläsern u. Kieselgelen durch bifunktionelle Silane (z. B. Aminoalkyltriethoxysilan od. Glycidoxypopyltrimethoxysilan u. a.), Amino-Gruppen am Träger mit Glutardialdehyd, Chlortriazin, Glycidol od. durch Diazotierung, Carboxy-Gruppen durch Carbonyldiimidazol, wasserlös. Carbodiimid u. aktivierte Ester u. Sulfid-Gruppen durch Disulfid-Austausch [2]. Eine Reihe direkt einsetzbarer aktivierter Träger ist im Handel erhältlich. Sie sind in erster Linie für Enzyme geeignet, aber auch Zellen u. Zellorganellen können auf diese Weise immobilisiert werden.

3. Bei der *Einschlußimmobilisierung* (auch Matrixeinhüllung, Geleinschluß) werden die Biokatalysatoren in Polymere mit meist gelartiger Struktur eingebettet. Dabei sollen Substrate u. Produkte der Reaktion, nicht jedoch die Biokatalysatoren, die Hüllsubstanz (Matrix) passieren können. Es werden verschiedene Substanzen eingesetzt, deren Gelbildungsprozesse bzw. Härtungen unterschiedlich verlaufen. Da natürliche Polymere wie Alginat, Agar, Carrageen, Pektin u. Gelatine ungiftig sind u. schonend gelieren, werden sie zur Immobilisierung von Zellen u. Mikroorganismen bevorzugt. Für immobilisierte Enzyme sind sie meist zu grobmaschig; sie werden durch Quervernetzung zusätzlich vernetzt. Gelatine u. Agar werden in Wasser heiß gelöst, anschließend nach dem Erkalten mit einer Lsg. od. Suspension des Biokatalysators vermischt u. zur Gelbildung in eine eisgekühlte Pufferlsg. eingetropft (Kältegelierung). Eine ionotrope Gelbildung findet dagegen statt, wenn Alginsäure od. Carrageen wäss. gelöst u. mit Zellen vermischt in CaCl_2 - bzw. KCl-Lsg. eingetropft od. gespritzt werden. Die genannten Immobilisate sind relativ weich, ionotrope Gele außerdem instabil in Ggw. von Gegenionen (z. B. Na^+ bei Calcium-gefestigten Alginaten), können aber durch einfache Trocknung gehärtet werden. Von Vorteil ist, daß die Biokatalysatoren innerhalb des Polymer-Netzwerkes in freier, nicht gebundener Form vorliegen. Dennoch wird eine erhebliche Diffusionslimitierung für Substrat- u. Produkt-Mol. beobachtet; makromol. Substrate sind nicht einsetzbar [3]. Für den techn. Einsatz ist die Kompressibilität der Partikel von entscheidender Bedeutung. Im Festbettreaktor müssen sie ausreichend formstabil sein, da andernfalls zu hohe Druckverluste in der Säule auftreten.

Für spezielle Anw. können Alginatpartikel mit einer semipermeablen Membran umschlossen werden (z. B. mit Hilfe von Polylysin) u. bei Bedarf das Alginatgel wieder solubilisiert werden. Hierdurch entstehen Mikrokapseln, in denen sich beispielsweise Insektenzellen kultivieren lassen [4]. Ebenso ist die Herst. maßgeschneiderter Hydrogele möglich [5]. Durch Polykondensation od. Polymerisation hergestellte Polymere (Epoxidharze, Polyurethane bzw. Polyacrylamid, -methacrylamide) sind für lebende Zellen weniger geeignet, da ihre Monomere meist zelltox. sind. Sie werden für Enzyme u. nicht vitale Zellen dagegen häufig eingesetzt. Bes. Polyacrylamid ist bedeutsam wegen seines dichten Netzwerkes. Prepolymere bieten einen Kompromiß, weil sie vorpolymerisiert sind u. in einem einfachen Schritt (Photovernetzung, Wasserzugabe) zu den finalen Polymerstrukturen verbunden werden können.

Die äußere Form der i. B. kann weit variiert werden: Kugeln, Zylinder, Fasern u. Folien sind üblich. Für Stoffumwandlungen werden Kugeln bevorzugt, für den Einsatz in Biosensoren dagegen

Membranen.

4. *Quervernetzung (E crosslinking)*: Durch bi- od. multifunktionelle Reagenzien [Diiso(thio)cyanate, Glutardialdehyd, Epichlorhydrin u. ä.] werden die Biokatalysatoren, meist unter Reaktion freier Amino-Gruppen, durch Vernetzung in polymere Aggregate umgewandelt. Diese i. B. sind zumeist gelatinös u. leicht verformbar, d. h. also nur für den Einsatz in durchströmten Rührreaktoren od. Fließbettreaktoren geeignet. Ein Nachteil dieser Meth. ist die relativ geringe spezif. Enzymaktivität, da die im Inneren der Partikel eingeschlossenen Biokatalysatoren für das Substrat schlecht zugänglich sind. Durch Co-Crosslinking anderer, inaktiver Komponenten (Gelatine, Albumin u. a.) können die mechan. u. enzymat. Eigenschaften wesentlich verbessert werden. Industrielle Bedeutung haben mit Glutardialdehyd vernetzte i. B. bei der Herst. von Fructose-Sirup (s. Isomeratzucker). Dort wird Bakterienzellmasse zu feinen Partikeln geformt u. mit Glutardialdehyd vernetzt. Glucose-Isomerase-Präp. werden auch durch Co-Crosslinking von Enzym mit Gelatine durch Glutardialdehyd hergestellt.

5. *Mikroverkapselung (E microencapsulation)*: Diese Meth. hat die Eingrenzung des Reaktionsraumes von Biokatalysatoren mit Hilfe von für Produkt u. Substrat durchlässigen Membranen zum Ziel.

Bei der *Grenzschichtpolykondensation* [6] werden die wäss. gelösten Enzyme zusammen mit einem hydrophilen Monomer (Di- u. Polyamine, Glykole, Polyphenole) in einem mit Wasser nicht mischbaren organ. Lsm. (z. B. Cyclohexan od. Chloroform) bis zur gewünschten Tröpfchengröße dispergiert. Dann wird ein hydrophobes Monomer (zwei- od. mehrbasige Säurechloride, Bishalogenformiate, Di- u. Polyisocyanate) zugesetzt, das sich nur in der organ. Phase löst (s. Abb. 1).

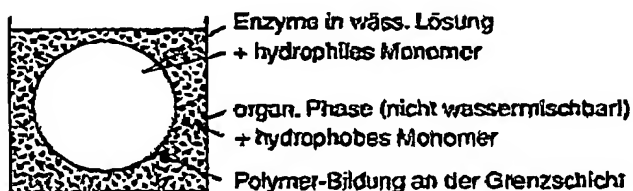


Abb. 1: Enzym-Einkapselung durch Grenzschichtkondensation (nach Hartmeier, Lit.).

Hydrophiles u. hydrophobes Monomer reagieren an der Grenzfläche zwischen wäss. u. organ. Phase unter Bildung eines Polymers (Polyamid, Polyurethan, Polyester od. Polyharnstoff, s. a. Koazervation), und es kommt zur Bildung von Mikrokapseln, in denen die Biokatalysatoren gelöst eingeschlossen sind. Ein Nachteil der Grenzschichtpolymerisierung ist der Kontakt der Enzyme mit den wäss. gelösten Monomeren und die damit verbundene Gefahr der Inaktivierung.

Die *Flüssigkeits-Trocknungsmeth.* vermeidet dies, indem sie von fertigen Polymeren ausgeht. Die Polymere (z. B. Ethylcellulose, Polystyrol) werden in einem organ., nicht wassermischbaren Lsm. gelöst, und das wäss. gelöste Enzym wird in dieser Phase emulgiert. Dieser ersten Emulsion wird

eine größere Menge eines Schutzkolloids (z. B. Albumin- od. Gelatine-Lsg.) zugemischt. So entsteht eine 2. Emulsion mit 3 Phasen (s. Abb. 2). Unter Vak. wird das organ. Lsm. verdampft. Das Polymer wird wieder fest u. umschließt nun das wäss. gelöste Enzym als Mikrokapsel. Ein Nachteil dieser Meth. ist, daß nur relativ große Kapseln entstehen (>20 µm Durchmesser).

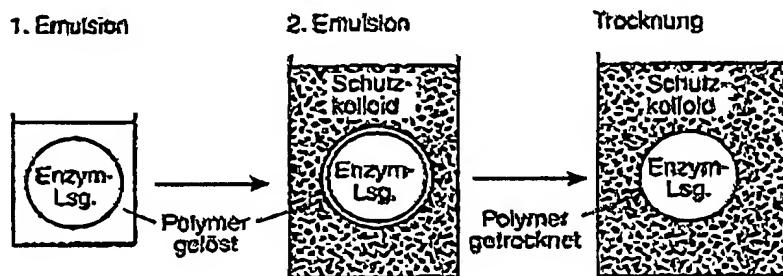


Abb. 2: Mikroverkapselung nach der Flüssigkeits-Trocknungsmeth. (nach Hartmeier, Lit.).

Statt in festen Mikrokapseln können die Biokatalysatoren auch in verformbaren, fluiden Lipidmembranen verpackt werden, die dann mit natürlichen Zellen vergleichbar sind. Diese Technik wird als Liposomen-Technik bezeichnet. Durch Ultraschallbehandlung wäss. Lsg. von Phospholipiden findet eine Aggregation zu Lipid-Doppelschichten mit hydrophilen inneren u. äußeren Oberflächen statt. In solche Liposomen eingeschlossene Enzyme können für medizin.-therapeut. Zwecke nützlich sein, sowie zum Studium natürlicher Membransysteme.

Eine Eingrenzung des Reaktionsraumes von Biokatalysatoren durch makroskop. Membransyst. liegt bei den zahlreichen Varianten von Membranbioreaktoren vor, bei denen die katalyt. Reaktion durch Ultrafiltrationsmembranen auf ein Teilvol. begrenzt wird, während der übrige Reaktorraum zum Transport kleiner, leicht diffundierender Substrat- u. Produkt-Mol. dient [7] (s. Hohlfaserreaktor sowie Enzym-Membranreaktor). Die Immobilisierung von mehreren verschiedenen Biokatalysatoren an einer Träger-Matrix od. von Enzymen einschließlich ihrer Coenzyme [8] erlaubt eine Cofaktorregenerierung bzw. eine Verkürzung der diffusiven Transportwege von Produkt bzw. Coprodukt.

Prozesse: Für die Auswahl der *Reaktoren* sind neben der Beschaffenheit u. den Eigenschaften der i. B. auch enzymkinet. Aspekte zu berücksichtigen. Für Reaktionen mit ausgesprochener Substrathemmung wird man bevorzugt kontinuierlich durchströmte Rührkessel-Reaktoren od. Mehrstufen-Rührreaktoren einsetzen, für Umsetzungen, die durch das Produkt gehemmt werden, v. a. Säulenreaktoren. Je nach Wertschöpfung und Betriebskosten des Prozesses kann der relative Anteil der Katalysator-Kosten zwischen <1% u. 50% liegen; daher ist neben der Wiederverw. des Katalysators auch der wiederholte Einsatz des Trägers von Bedeutung [9]. Bei ionogen od. adsorptiv gebundenen Enzymen läßt sich die im Prozeß durch Desorption verlorene Aktivität oft durch einfaches Nachspülen mit Enzym-Lsg. wieder regenerieren. Die Effektivität eines Katalysators u. seine Stabilität (HWZ) unter Betriebsbedingungen gehen ebenso in die Wirtschaftlichkeits-Berechnung ein wie die Produkt- u. Substrat-Kosten. In manchen Fällen kann eine unvollständig ablaufende Umsetzung wirtschaftlicher sein als eine mit 100% Ausbeute.

Immobilisierte Enzyme: Prinzipiell lassen sich Enzyme mit allen oben genannten Meth. immobilisieren. Die adsorptive Bindung an Trägermaterialien wird bevorzugt beim Einsatz in organ. Lsm. verwendet. Zu den neueren Entwicklungen zählt – a) die Immobilisierung von Enzymen in sog. Sol-Gelen, bei denen der Biokatalysator in einer Matrix aus z. B. Tetramethoxysilan u. Alkyltrimethoxysilan eingeschlossen wird u. eine bis zu 100fach höhere Aktivität in organ. Lsm. aufweist [10] u. – b) die Quervernetzung von Enzymkristallen (Cross-linked Enzyme Crystals, ChiroCLEC®). Die hierdurch erhaltenen immobilisierten Enzyme zeichnen sich durch eine höhere Temp.-Stabilität u. Stereoselektivität aus [11]. Eine Reihe von immobilisierten Enzymen werden großtechn. zur Herst. von opt. reinen Aminen u. Spezialfetten u. Detergenzien eingesetzt (z. B. Lipasen) u. finden breite Anw. in Biosensoren (s. a. Enzymsensoren).

Immobilisierte Mikroorganismen: Für Ein-Enzym-Reaktionen kann ggf. auf die Isolierung des Enzyms verzichtet werden. Man kultiviert Zellen unter Bedingungen, unter denen sie möglichst hohe Enzymaktivitäten haben u. benutzt die inaktiven Zellen nach geeigneter Copolymerisation (z. B. Zugabe eines neutralen Proteins u. Vernetzung mit Glutardialdehyd) direkt als immobilisierte Biokatalysatoren. Enzyme haben so in ihrem natürlichen Mikro-Milieu oft höhere Stabilitäten u. Aktivitäten als isolierte Enzyme. In anderen Fällen hat sich der Einschluß von vitalen Zellen in Polymere (z. B. Carrageen) bewährt; durch Inkubation dieser i. B. in einem geeigneten Nährmedium unter Wachstumsbedingungen erreicht man eine hohe Zellvermehrung innerhalb der Partikel. Diese können dann für den eigentlichen Prozeß (z. B. alkoholische Gärung) eingesetzt u. ggf. durch erneute Inkubation auch wieder regeneriert werden. Die Co-Immobilisierung aufeinander abgestimmter Mikroorganismen ist ebenso möglich u. kann in ausgewählten Syst. zur Steigerung der Effektivität u. Produktivität führen [12]. Eine weitere Variante bieten photovernetzable Polymere: Eine Mikroorganismen-Suspension mit den lösl. Prepolymeren wird in dünner Schicht durch Bestrahlung mit einer Tageslicht-Lampe polymerisiert, u. die erhaltenen, katalyt. aktiven Folien lassen sich für zahlreiche Prozesse (Biotransformation od. in Membranreaktoren) einsetzen.

Die Immobilisierung bewirkt im allg. eine Veränderung der Produktzusammensetzung u. erfordert deshalb zusätzliche Maßnahmen, um eine bestimmte Produktqualität einzustellen, z. B. zur Bierherstellung [13].

Immobilisierte Tierzellen: *In vitro* kultivierte adhärente u. lymphoide tier. Zellen lassen sich durch Feststoffe unterschiedlicher Matrices binden. Als Träger finden verschiedene dreidimensionale Netzwerke u. geschlossene Kompartimente Verwendung. Die an die Matrix gebundenen Zellen bewachsen die Trägeroberfläche (adhärente Zellen) od. werden von ihr physikal. mehr od. weniger zurückgehalten (Blutzellen, Hybridoma-Zellen). Man unterscheidet generell Einschluß- u. Zellrückhalte-Verf. u. setzt diese heterogenen Kultursyst. den homogenen Suspensions-Verf. entgegen. Einschluß-Syst. immobilisieren die Zellen innerhalb eines Kompartiments, das sie von der Umgebung durch eine semipermeable Membran schützt (Hohlfaser-Bioreaktor, Mikroverkapselung), wohingegen die Zellrückhalte-Meth. ein Substrat mit den physikal. Eigenschaften bereitstellt, das die Zellen einzufangen u. zu halten vermag, so daß sie nicht mit dem

Medienstrom aus der Reaktionseinheit ausgeströmt werden können (geschlossene u. offen-poröse Mikrocarrier, Opticell®-Bioreaktor, Festbett). Dies gilt auch für Suspensionszellen, die sehr viel schlechter an die Matrix anheften od. adsorbieren. Adhärente Zellen ziehen großen Nutzen aus der stark vergrößerten Oberfläche solchen Materials. Viele Immobilisierungs-Materialien schützen die Zellen gegen durch starkes Rühren od. hohe Perfusionsraten verursachten mechan. Streß. Verglichen mit der klass. Rollflaschen-Kultur sind mit Immobilisierungs-Verf. ca. 10mal höhere Zellkonz. von $5 - 50 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$ je nach verwendetem Syst. erreichbar. Immobilisierte Tierzellen werden zur Produktion großer Zellmengen, von Viren, Vakzinen u. therapeut. Proteinen wie Interferonen, Interleukinen etc. genutzt, jedoch zunehmend von homogenen Verf. (Zell-Suspensionskulturen), die wesentlich leichter zu kontrollieren u. darüber hinaus auch weniger kostenintensiv sind, abgelöst.

Immobilisierte Pflanzenzellen: Aufgrund ihres großen Biotransformations- u. Synth.-Potentials bes. für sek. Naturstoffe haben Pflanzenzellen ebenfalls gute Perspektiven bei der industriellen Anw. von i. Biokatalysatoren. Für die Synth. sek. Produkte sind komplizierte Stoffwechselketten erforderlich, die nur unter gleichzeitiger Erhaltung der Lebensfähigkeit der betreffenden Pflanzenzellen funktionsfähig bleiben [14]. Die zur Immobilisierung vorgesehenen Pflanzenzellen stammen meist aus Zellkulturen (Pflanzenzellkulturen), die fast ausschließlich durch Einschluß in polymere Matrices polymerisiert werden.

Verwendung:

Einige Beisp. für die Verw. von i. B. im techn. Bereich sind in Tab. 2 wiedergegeben (s. a. Lit. [15]).

Tab.2: Beisp. für industriell genutzte immobilisierte Zellen u. Enzyme.

Zellspecies	verwendete Enzyme	Anw.	Immobilisierungsmeth.
<i>Actinoplanes missouriensis</i>	Glucose-Isomerase	Produktion von Isomeratzucker	mit Gelatine vermischt, mit Glutaraldehyd quervernetzt
<i>Bacillus coagulans</i>			mit Glutaraldehyd quervernetzt
<i>Bacillus</i> sp.	β -Galactosidase	Lactose-Hydrolyse	
<i>Brevibacterium flavum</i>	Fumarase	Produktion von Malat aus Fumarat	Geleinschluß in Carrageen
<i>Escherichia coli</i>	Aspartase	Produktion von L-Aspartat aus Ammoniumfumarat	
	Penicillin-Acylase	Produktion von 6-Aminopenicillansäure aus Penicillin	Einschluß in Polyacrylamid Glutaraldehyd-vernetzte Gelatine
<i>E. coli</i> + <i>Pseudomonas dacunhae</i>	Aspartase + L-Aspartat-4-Decarboxylase	Produktion von L-Alanin aus Fumarat	Geleinschluß in Carrageen
<i>Mortierella vinacea</i>	α -Galactosidase	Hydrolyse von Raffinose	Quervernetzung mit Glutaraldehyd
<i>Proteus rettgeri</i>	Penicillin-Acylase	Produktion von 6-Aminopenicillansäure aus Penicillin	Bindung an Glycidylmethacrylat mit Glutaraldehyd
<i>Saccharomyces</i>	Glykolyse-Enzyme	Produktion von Ethanol	Geleinschluß in Alginat

<i>cerevisiae</i>	u. Enzyme der Alkohol- Gärung		Geleinschluß in ENT-Polymere
<i>Streptomyces albus</i>	Glucose- Isomerase	Produktion von Isomerzucker	Hitzebehandlung u. Filterreaktor
<i>Streptomyces olivaceus</i>			auf keram. Trägern mit Polyamin u. Glutaraldehyd quervernetzt
<i>Aspergillus oryzae</i>	Aminoacylase	asymmetr. Hydrolyse von D,L-Aminosäuren	Adsorption an DEAE-Sephadex
<i>Pseudomonas</i> sp.	Cephalosporin- Amidase	Produktion von 7-Amino- cephalosporansäure aus Cephalosporin	Adsorption an Polystyrol-Anionenaustauscher u. Vernetzung mit Glutardialdehyd
<i>Rhodococcus rhodachrous</i>	Nitrilhydratase	Produktion von Acrylamid	Einschluß in Polyacrylamid

Den größten Anteil am Gesamtumsatz hat als i. B. die Glucose-Isomerase. Im Vergleich zu lösl. Biokatalysatoren ist der Beitrag i. B. an techn. Prozessen allerdings gering. Gründe für die eingeschränkte techn. Nutzung von i. B. sind:

- die "ungereinigten Enzyme" werden für den Abbau von Polymeren eingesetzt (Stärke, Pektine) od. als Waschmittelenzyme. Hierfür sind i. B. ungeeignet;
- die meisten techn. Enzyme sind so billig geworden, daß das Wegwerfen ökonomischer ist als die Immobilisierung;
- viele potentielle Verf. mit i. B. sind noch zu teuer, um mit den Prozessen mit lösl. Enzymen konkurrieren zu können.

Übersetzungen:

E immobilized biocatalysts

Literatur:

- [1] Agric. Biol. Chem. **33**, 1053 (1969).
 - [2] Hermanson et al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, San Diego: Academic Press Inc. 1992.
 - [3] Proc. Biochem. **33**, 21 (1998).
 - [4] Cytotechnology **20**, 199 (1996).
 - [5] Biotechnol. Bioeng. **50**, 357 (1996).
 - [6] Hartmeier, Immobilisierte Biokatalysatoren, Berlin: Springer 1986.
 - [7] J. Biotechnol. **59**, 133 (1997).
 - [8] Rehm-Reed **8** a, 407.
 - [9] Biotechnol. Bioeng. **52**, 290 (1996).
 - [10] Angew. Chem., Int. Ed. Engl. **34**, 301 (1995).
 - [11] J. Am. Chem. Soc. **117**, 6845 (1995); Trends Biotechnol. **14**, 223 (1996); Curr. Opin. Chem. Biol. **3**, 35 (1999).
 - [12] Enzyme Microb. Technol. **17**, 636 (1995).
 - [13] Enzyme Microb. Technol. **16**, 365 (1994); Nakanishi et al., in Tanaka, Tosa u. Kobayashi (Hrsg.), Industrial Applications of Immobilized Biocatalysts, S. 275–289, New York: Dekker 1993.
 - [14] Enzyme Microb. Technol. **11**, 546 (1989).
 - [15] Tanaka, Tosa u. Kobayashi (Hrsg.), Industrial Application of Immobilized Biocatalysts, New York: Dekker 1993.
- Buchholz u. Kasche, S. 141–269
Hartmeier, Immobilisierte Biokatalysatoren, Berlin: Springer 1986
Methods Enzymol. **135** (1987); **136** (1987); **137** (1988)
Prog. Biotechnol. **11** (1996)

Ullmann, Immobilized Biocatalysts, Electronic Release, 6. Aufl.; Wiley-VCH: Weinheim, (2001).

Copyright © 2004 Georg Thieme Verlag. Alle Rechte vorbehalten.
Dokumentkennung RD-09-00293
<http://www.roempp.com>

1

The most commonly used method for immobilized biocatalysts is the *inclusion* in three-dimensional networks (*E* matrix entrapment). In doing so, polymerization and gelatinization, respectively, are carried out in an aqueous solution in the presence of the biocatalyst. In the most simple case (gelatin, agar), the polymer is first dissolved in the hot state in water, is subsequently - upon chilling - mixed with a solution or suspension of the biocatalyst and is dropped into an ice-cooled buffered solution.

2

During *inclusion immobilization* (also matrix enveloping, gel inclusion), the biocatalysts are embedded in polymers exhibiting a mostly gel-like structure. Thereby, substrates and products of the reaction, but not the biocatalysts, are supposed to be able to pass the enveloping substance (matrix).